

晶体蛋白与白内障发病机制研究

杜植鹏^{1,2}, 吴燕^{1,3}, 李闻捷¹

基金项目: 中国军队基金资助项目(No. 2009ZXJ09004-063)

作者单位: (200433) 中国上海市, 第二军医大学长海医院¹实验科; ²临床医学系; ³(402560) 中国重庆市铜梁县人民医院检验科

作者简介: 杜植鹏, 本科, 第二军医大学临床医学专业学员。

通讯作者: 李闻捷, 博士, 研究员, 研究方向: 白内障发病机制。wenjieli@pku.org.cn

收稿日期: 2009-05-04 修回日期: 2009-09-07

Advances in research of crystallin and pathogenesis of cataract

Zhi-Peng Du^{1,2}, Yan Wu^{1,3}, Wen-Jie Li¹

Foundation item: Sponsored by Chinese PLA (No. 2009ZXJ09004-063)

¹Clinical Laboratory of Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ²Department of Clinical Medicine, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³Clinical Laboratory, People's Hospital of Tongliang, Chongqing 402560, China

Correspondence to: Wen-Jie Li. Clinical Laboratory of Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. wenjieli@pku.org.cn

Received: 2009-05-04 Accepted: 2009-09-07

Abstract

• Cataract is a common and frequently-occurring disease which seriously affects human health. The researches on the etiology of cataract and its influencing factors, are effective measures for the prevention and treatment of cataract. Occurrence of cataract is initiated by the crystal light-admitting quality change; the crystal light-admitting quality is decided by the crystal ordered structure. This article summarized the relationship between related crystal protein composition and structure, post-translational modification, heat shock proteins and cataract pathogenesis.

• KEYWORDS: crystallin; cataract; post-translational modification; heat shock proteins

Du ZP, Wu Y, Li WJ. Advances in research of crystallin and pathogenesis of cataract. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(10):1923-1925

摘要

白内障是严重影响人类健康的常见病、多发病。研究白内障的病因学及影响因素, 是预防和治疗该病的有力措施。白内障主要是因晶状体的透光性改变所引发; 晶状体的透光性是由晶体蛋白的有序结构所决定的。本文综述近年

来有关晶体蛋白的组成与结构、翻译后修饰及热休克蛋白与白内障发病机制的关系。

关键词: 晶体蛋白; 白内障; 翻译后修饰; 热休克蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2009.10.026

杜植鹏, 吴燕, 李闻捷. 晶体蛋白与白内障发病机制研究. 国际眼科杂志 2009;9(10):1923-1925

0 引言

晶状体混浊称为白内障, 是最常见的致盲原因之一。国外有资料表明: 55~64 岁年龄段人群中, 45% 患有不同程度老年性白内障; 65~74 岁年龄段患病率达 75%; 而 75 岁以上人群, 患病率高达 88%^[1]。近年来, 对白内障的发生、发展、药物防治和手术治疗等研究有了进一步认识, 但迄今对白内障的发病机制尚未完全达成共识。目前认为由于晶体蛋白的氧化损伤、翻译后修饰等, 使得晶体蛋白水溶性降低, 导致晶状体混浊, 引起视力下降。晶体蛋白是晶状体上皮细胞的主要成分, 约占晶状体中水溶性蛋白的 90%, 依据其在电场中的迁移能力, 分为 α 、 β 、 γ 3 种晶体蛋白。大量的研究表明, 白内障的发生与自由基的产生、氧化损伤、晶体蛋白比例改变及晶状体上皮细胞的凋亡有直接关系^[2]。而晶状体中含有丰富的热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs) 对晶状体上皮及晶体蛋白维持正常的生理活动起着重要的作用。近来的研究表明, HSP 可帮助晶状体中新合成的蛋白质分子获得天然构象, 保护它们免受应激损害, 阻止蛋白质的不正确折叠或变性, 或帮助变性的蛋白质复性^[3]。我们就晶体蛋白的组成与结构、翻译后修饰及热休克蛋白与白内障发病机制的关系, 综述如下。

1 晶体蛋白的结构与功能

1.1 α -晶体蛋白 α -晶体蛋白分为两类: αA 和 αB , 两类蛋白肽链序列同源率为 55%, αA -晶体蛋白仅局限于晶状体内表达, 其它组织仅有痕量被发现^[3]。因此, 可以说 αA -晶体蛋白是晶状体特异性蛋白。而 αB -晶体蛋白在组织中广泛表达, 在晶状体外组织中亦有存在, 特别是在脑、心和肌肉组织中含量比较丰富。 α 晶体蛋白既是晶状体主要结构蛋白, 又具有重要的分子伴侣功能。Horwitz^[4] 研究认为, α 晶体蛋白与变性的蛋白质结合, 阻止非特异性聚集, 有助于维持晶体蛋白的水溶性, 从而保持晶状体透明。Graw 等^[5] 研究发现: αA -晶体蛋白基因突变小鼠在开眼时即出现以核性混浊与后缝合处异常为特征的白内障, 并逐渐发展为核性白内障。

1.2 β -晶体蛋白 β -晶体蛋白有若干种多肽, 其中约有 6 种多肽($\beta A1/3$, $\beta A2$, $\beta A4$ 及 $\beta B1$, $\beta B2$, $\beta B3$) 是基因产物, 其它则是翻译后修饰衍生物或是高分子量聚合物(HMW)。这 6 种 β -晶体蛋白被分为两大类: 酸性蛋白, 包括 $\beta A1/3$, $\beta A2$, $\beta A4$ -晶体蛋白; 碱性蛋白, 包括 $\beta B1$, $\beta B2$, $\beta B3$ -晶体蛋白。其中 $\beta B2$ -晶体蛋白在该族蛋白中相对含量最高^[6], 抗修饰变异能力强。大部分该族晶体蛋白如 $\beta A1$,

$\beta A3$ 及 $\beta B1$ 具有亲水性的 N-末端,但随晶状体老化,均易丢失多肽末端或去乙酰化,降低对蛋白变性的保护作用;而 $\beta B2$ 能较好的保持其亲水性的 N-末端,显示出 $\beta B2$ 较其它 β 族晶体蛋白更能抵抗翻译后的修饰变异^[7]。张军等^[8]在建立 $\beta B2$ 晶体蛋白基因敲除小鼠模型时发现: $\beta B2$ 基因敲除的小鼠出生后 1.5mo 左右,80%左右的小鼠晶状体即发生混浊,提示 $\beta B2$ 基因与白内障的发生具有密切关系。李闻捷等研究提示: $\beta B2$ 水溶性蛋白成份随老化升高有利于维持晶状体透光性;年龄越大,越需要新生水溶性 $\beta B2$ 蛋白不断补充由于老化所导致的水溶性成份的丢失,使之呈现年龄依赖性升高^[7]。

1.3 γ -晶体蛋白 γ -晶体蛋白同 β -晶体蛋白组成了 β/γ 蛋白超家族, γ -晶体蛋白在晶状体核中表达丰富,对晶状体的发育、细胞分化以及保持透明性有重要作用。当 γ -晶体蛋白基因突变,使其构象改变,减弱了与其他晶体蛋白相互作用的能力以及在加热和水溶状态下的稳定性,最终导致晶状体混浊;或降低其溶解性导致晶状体出现混浊。

2 晶体蛋白的翻译后修饰

α 晶体蛋白作为晶状体主要的结构蛋白,同时具有分子伴侣的效应,主要表现为抑制蛋白质的聚集以及酶的失活^[9,10],有利于维持晶状体的透明。有研究证明,当晶状体内的 α 晶体蛋白受到包括磷酸化、糖基化、氨甲酰化、脱酰胺化、紫外线照射^[11] 等翻译后修饰 (post translational modification, PTM) 的严重影响时,其分子伴侣活性的保护作用也将明显下降,进而造成晶状体代谢酶对各类损伤的易感性增加,导致晶状体代谢障碍,这可能是白内障发病的关键因素之一^[12]。

2.1 磷酸化作用 α -晶体蛋白的丝氨酸基团,主要通过晶状体上皮细胞和皮质纤维细胞的 cAMP 依赖蛋白激酶通路和非依赖通路而被部分磷酸化。磷酸化使 α -晶体蛋白的分子伴侣活性下降,易形成多聚复合物的核心,导致白内障形成^[13]。

2.2 糖基化 在高血糖或高半乳糖等病理情况下,晶体蛋白的游离氨基与糖分子中醛基结合后,发生非酶糖基化反应 (Maillard 反应)。表面电荷的分布和分子结构发生改变,内部疏基基团暴露出来,氧化形成二硫键,最终形成高分子聚合产物 (糖基化产物),导致晶状体光散射增加,最终形成白内障^[14]。

2.3 氨甲酰化作用 氰酸盐是氨甲酰化的活性物质,其含量随年龄增加而增加。生理性 pH 环境下,氰酸盐可逆地与蛋白质巯基或不可逆地与氨基 (主要是赖氨酸的 ϵ 氨基) 共价结合。氰酸钠等氰酸盐可造成 α -晶体蛋白广泛的酸化,但并未降低其分子伴侣活性^[15],而较严重的氨甲酰化使 α -晶体蛋白形成广泛稳定的交联,可导致分子伴侣活性降低甚至丧失^[16]。氨甲酰化造成严重的晶体蛋白结构性变化,破坏晶状体保持透明性所必须的蛋白质的紧密连接,使晶体蛋白的聚集增加,从而形成白内障^[17]。

2.4 脱酰胺化作用 脱酰胺化作用抑制蛋白质的功能。在晶状体老化和白内障形成中,晶体蛋白的脱酰胺化增长。其常见基团为谷氨酸和天冬酰胺。Srivastava 等^[18] 检测到白内障患者晶状体非水溶性部分 Asn108, Gln146 脱酰胺化,致 $\alpha B2$ 晶体蛋白结构和功能改变,参与白内障的形成。

2.5 紫外线辐射作用 研究表明紫外线 (UV) 作用于晶状体时,可以产生氧自由基^[19]。氧化损伤是 UV 导致白内障

的主要机制,可引起离子失衡,蛋白交联,膜裂解,细胞凋亡,原癌基因过度表达等变化。晶状体虽有其自身的抗氧化系统,但它与氧化损伤之间的失衡是白内障发生的关键^[20,21]。 α -晶体蛋白能阻止紫外线引起的晶状体细胞死亡^[22],从而延缓白内障的发生。

3 热休克蛋白

热休克蛋白是细胞在环境温度升高或非生理条件下 (如热刺激、缺氧、感染及重金属等) 被诱导产生的蛋白质,又叫应激蛋白 (stress protein)。Akerfelt 等^[23] 认为 HSPs 的产生是细胞应激反应的共同机制。Horowitz 等^[24] 研究发现 HSPs 有保护细胞上皮的完整性,对机体细胞起着保护作用,使之避免应激因子的损伤。还有研究显示, HSP 可以抑制异常的细胞死亡途径^[25],并可作为分子伴侣 (molecular chaperones),通过热休克转录因子 (heat shock transcription factor) 发挥其功能,保护细胞免受化学及物理因素对蛋白质的毒性^[23]。晶状体中含有丰富的 HSP,他们对晶状体上皮及晶体蛋白维持正常的生理活动起着重要的作用。有研究表明, HSP 可帮助晶状体中新合成的蛋白质分子获得天然构象,以阻止蛋白质的不正确折叠或变性,或帮助变性的蛋白质复性^[3]。

3.1 HSP70 近来有研究表明,在热应激晚期 HSP70 及小分子热休克蛋白 α -晶体蛋白明显增加^[26]。Banh 等^[27] 利用小鼠晶状体实验研究发现, HSP70 在阻止转化生长因子 $\beta 2$ (Transforming growth factor- $\beta 2$, TGF- $\beta 2$) 产生上皮细胞向间质细胞转化因子上起着保护作用,提高晶状体细胞生存能力。Dean 等^[28] 认为:一些正常的生理环境,例如光照等,对于晶状体来说亦是一种特殊的应激态,可以诱导 HSP 的产生,对晶状体的氧化损伤起到保护作用。Bagchi 等^[29] 观察到, HSP70 和 HSP40 存在于晶状体上皮内和皮质纤维,且随年龄增大而下降,推测其下降可能与老年性白内障的发病有关。进一步研究还发现体外培养的小鼠晶状体上皮细胞在氧化、高渗等刺激下, HSP70 的表达增加^[30]。李莹等^[31] 采用免疫组织化学染色观察到年龄相关性白内障中 HSP70 含量明显高于对照组,推测在年龄相关性白内障中 HSP70 表达增加,以发挥其细胞保护、分子伴侣、热耐受、信号传导及调节凋亡、抗氧化及免疫等方面的重要作用。Yao 等^[32] 实验研究证明,在外伤性白内障大鼠中 HSP70 明显高于对照组,推测 HSP70 对外伤性晶体蛋白变性同样具有保护作用。

3.2 HSP27 HSP27 是小分子热休克蛋白家族中重要的一员,分为诱导型和构成型,在许多应激的情况下,诱导型的 HSP27 表达增多, Zhang 等^[33] 发现,在氧化应激时,晶状体上皮 HSP27 的表达是受 P38 蛋白激酶调控。作为小分子热休克蛋白, HSP27 作为分子伴侣和通过阻止变性蛋白的聚集发挥保护细胞功能^[34]。有研究表明, HSP27 存在于晶状体内,并随年龄增大含量增多,提示其作用可能为防止部分变性蛋白质进一步变性或聚集的作用; Bagchi 也发现一些小分子热休克蛋白如 HSP27 和 α -晶体蛋白广泛分布于晶状体之中^[29]。Hawse 等^[35] 在镉、铜等有害金属的作用下,应用反转录多聚酶链反应 (reverse transcription PCR, RT-PCR) 对热休克蛋白基因进行检测,结果发现晶状体上皮细胞的 α -晶体蛋白、HSP27 等小分子热休克蛋白表达增高,推测 HSP27 对金属诱导的应激反应具有保护作用。

4 结语

随着白内障发病率的增加,对白内障的认识,尤其是

年龄相关性白内障的认识显得尤为重要。晶体蛋白作为晶状体重要的组成部分,其结构与功能的改变常与白内障的形成密切相关。而晶体蛋白的改变受年龄、环境、遗传等诸多因素的影响。对晶体蛋白的研究有利于我们更深刻、全面地把握白内障发病的关键环节,完善该病的预防及治疗。如何减少晶状体的氧化损伤和 PTM 对晶体蛋白的影响,以及是否能利用诱导 HSP 产生、内外用药的方式,延缓白内障的发生,对白内障的预防与治疗有着重要的意义。在开发新药,制定新治疗方案,具有指导意义,值得进一步研究。

参考文献

- 1 Bloemendal H, Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision; structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol* 2004;86(3):407-485
- 2 葛坚,赵家良. 眼科学. 北京:人民卫生出版社 2005:214-215
- 3 饶惠英,姚克. 热休克蛋白在眼晶状体的表达与热耐受. 国外医学眼科学分册 2004;28(3):185-188
- 4 Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Pro Natl Acad Sci U S A* 1992;89(21):10449-10453
- 5 Graw J, Loster J, Soewarto D, et al. Characterization of a new, dominant V124E mutation in the mouse α A-crystallin-encoding gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2909-2915
- 6 赵惠仁,胡书群,裴冬生,等. 大鼠 β B2-晶体蛋白的克隆、高效表达及纯化. 生物化学与生物物理学报 2000;32(1):21-25
- 7 李闻捷,Joseph-Fu S.-C. 晶体蛋白 β B2 对眼晶状体老化的影响. 中国病理生理杂志 2004;20(10):1905-1907
- 8 张军,黄才国,李闻捷,等. β B2 晶体蛋白基因敲除小鼠模型的建立. 第二军医大学学报 2006;27(11):1246-1248
- 9 Derham BK, Harding JJ. Effects of modifications of α -crystallin on its chaperone and other properties. *Biochem J* 2002;364(Pt 3):711-717
- 10 严宏. 翻译后修饰对 α -晶体蛋白分子伴侣活性的影响及白内障形成机制. 国外医学眼科学分册 2002;26(2):108-112
- 11 严宏,惠延年,范建国,等. 糖基化对 α 晶状体蛋白的修饰和分子伴侣活性的降低. 眼科新进展 2003;23(2):86-89
- 12 仝佳,王胜军,肖秦华. 热休克蛋白及其在眼部疾病中作用的研究进展. 国际眼科杂志 2006;6(1):152-157
- 13 柴飞燕,严宏. 蛋白质组学在白内障研究中的应用. 眼科研究 2006;24(3):327-329
- 14 刘梦蕾,李闻捷. 晶体蛋白与白内障学研究进展. 现代临床医学生物工程杂志 2005;11(1):4-7
- 15 van Boekel MA, Hoogakker SE, Harding JJ, et al. The influence of some post-translational modifications on the chaperone-like activity of alpha-crystallin. *Ophthalmic Res* 1996;28(1):32-38
- 16 Plater ML, Goode D, Crabbe MJ. Ibuprofen protects alpha-crystallin against posttranslational modification by preventing protein cross-linking. *Ophthalmic Res* 1997;29(6):421-428
- 17 Wistow G. Possible tetramer-based quaternary structure for the alpha-crystallins and small heat-shock proteins. *Exp Eye Res* 1993;56(6):729-732
- 18 Srivastava OP, Srivastava K. Existence of deamidated α B-crystallin fragments in normal and cataractous human lenses. *Mol Vis* 2003;9:110-118
- 19 Javitt JC, Taylor HR. Cataract and latitude. *Doc Ophthalmol* 1994;95:88(3-4):307-325
- 20 李德馨,王思玲,苏德森. 白内障的发病机制与药物治疗. 沈阳药科大学学报 2002;19(4):300-307
- 21 崔蓓,付清,柳林,等. 紫外线辐射致大鼠白内障模型的建立. 国际眼科杂志 2009;9(5):836-838
- 22 Liu JP, Schlosser R, Ma WY, et al. Human alphaA-and alphaB-crystallins prevent UVA-induced apoptosis through regulation of PKC alpha, RAF/MEK/ERK and AKT signaling pathways. *Exp Eye Res* 2004;79(3):393-403
- 23 Akerfelt M, Trouillet D, Mezger V, et al. Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1113:15-27
- 24 Horowitz M, Robinson SD. Heat shock proteins and the heat shock response during hyperthermia and its modulation by altered physiological conditions. *Prog Brain Res* 2007;162:433-446
- 25 Hayashida N, Inouye S, Fujimoto M, et al. A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *EMBO J* 2006;25(20):4773-4783
- 26 Bagchi M, Besser D, Reddy TR, et al. Effect of thermal stress on early and late passaged mouse lens epithelial cells. *Cell Biochem* 2007;102(4):1036-1042
- 27 Banh A, Deschamps PA, Vijayan MM, et al. The role of Hsp70 and Hsp90 in TGF-beta induced epithelial-to-mesenchymal transition in rat lens epithelial explants. *Mol Vis* 2007;13:2248-2262
- 28 Dean DO, Kent CR, Tytell M. Constitutive and inducible heat shock protein70 immunoreactivity in the normal rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(12):2952-2962
- 29 Bagchi M, Katar M, Maisel H. Heat shock proteins of adult and embryonic human ocular lenses. *Cell Biochem* 2002;84(2):278-284
- 30 Bagchi M, Katar M, Maisel H, et al. Effect of exogenous stress on the tissue cultured mouse lens epithelial cells. *Cell Biochem* 2002;86(2):302-306
- 31 李莹,王玉清,曹丽辉,等. 热休克蛋白 70 在老年性白内障晶状体上皮细胞中的表达及意义. 黑龙江医药科学 2006;29(4):45-46
- 32 Yao K, Rao H, Wu R, et al. Expression of Hsp70 and Hsp27 in lens epithelial cells in contused eye of rat modulated by thermotolerance or quercetin. *Mol Vis* 2006;12:445-450
- 33 Zhang XY, Zhang JS, Kong W, et al. Oxidative stress induced HSP27 expression in human lens epithelial cells is regulated by P38 map kinase. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2005;41(1):47-51
- 34 Laksanalami P, Robb FT. Small heat shock proteins from extremophiles a review. *Extremophiles* 2004;8(1):1-11
- 35 Hawse JR, Cumming JR, Oppermann B, et al. Activation of metallothioneins and alpha-crystallin or HSPs in human lens epithelial cells by specific metals and the metal content of aging clear human lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(2):672-679